

THESIS

TÜBINGEN

1967

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. Roemer

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Untersuchungen über Aldolase und unspezifische
Phosphatasen im Schweineovar

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GERT FRÖSNER
aus Tübingen

8896

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr.med.Roemer

Untersuchungen über Aldolase und unspezifische
Phosphatasen im Schweineovar

=====

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
G e r t F r ö s n e r
aus Tübingen

Dekan: Professor Dr.med. Schneider

1.Berichterstatter: Dozent Dr.med.Jung

2.Berichterstatter: Professor Dr.med. Roemer

Herrn Dozent Dr.med. J u n g bin ich für die
Überlassung des Themas und für vielseitige Unter-
stützung während der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

=====

I. Einführung

1

1. Allgemeines über Fermente
2. Allgemeines über die Aldolase
3. Allgemeines über die Phosphatasen

II. Methodik

7

A. Aldolase

1. Die Stickstoffbestimmung
2. Die Fermentgewinnung
3. Die Aldolasebestimmung

B. Phosphatasen

1. Fermentgewinnung
2. Über Sephadex-Ionenaustauscher
3. Die Proteinbestimmung
4. Aktivitätsbestimmung der Phosphatasen

III. Eigene Ergebnisse

18

A. Aldolase

1. Über den Aldolase-Test
2. Aldolase im Liquor folliculi
3. Versuche mit Triton X-100
4. Zellfraktionierung des Corpus luteum
5. Zellfraktionierung des Corpus rubrum
6. Diskussion

B. Phosphatasen

1. Alkalische Phosphatasen
2. Saure Phosphatasen
3. Erfahrungen mit Sephadex
4. Diskussion
 - a) Besprechung der Ergebnisse der alkalischen

Phosphatasen

b) Besprechung der Ergebnisse der sauren Phosphatasen

IV. Zusammenfassung

42

V. Literaturverzeichnis

43

VI. Abkürzungen

46



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINFÜHRUNG

1. Allgemeines über Fermente

Fermente sind Biokatalysatoren. Sie beschleunigen Reaktionen, wirken auf die Richtung der Reaktion, können aber nicht das Gleichgewicht der Reaktionspartner verändern.

Sie fördern also nur die Schnelligkeit der Gleichgewichtseinstellung. Statt in Monaten vollzieht sich diese in Sekunden.

Heute allgemein anerkannt ist die Theorie, daß die Fermente nicht frei im Cytoplasma der Zellen herumschwimmen, sondern größtenteils an den Wänden der Zellorganellen (Mitochondrien, Mikrosomen = Endoplasmatisches Retikulum, Kerne), schon in der rechten Reihenfolge für lange Reaktionsabläufe, festsitzen und das Substrat an ihnen vorbei weitergereicht wird.

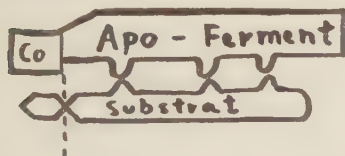
Die Theorie wurde aus der Überlegung geboren, daß die Zelle ihre etwa 10 000 Fermente nur enthalten kann, wenn diese gleichzeitig strukturbildend sind. Die Fermente stellen also Mauer und Maschinen der Zellen dar.

Durch die modernen Zentrifugen ist es möglich geworden, die verschiedenen Zellbestandteile getrennt auf ihre Fermentaktivität zu untersuchen. Dabei ist eine vorwiegende Lokalisation von Fermentsystemen in bestimmten Zellbestandteilen entdeckt worden.

Der Kern enthält im allgemeinen sehr wenig Fermente. Er ist jedoch zu synthetischen Prozessen, wie die Knüpfung von Peptidbindungen und die Bildung von Lipiden und Nucleotiden, befähigt.

Die Mitochondrien besitzen die Fettsäure-Biosynthese und den Fettabbau, den Citronensäurezyklus und die Atmungskette. Das energieliefernde ATP wird dort ge-

ist also bestimmend für die Substratspezifität des Fermentes.



Auf eine zweite Wirkung des Apoferments, die Polarisierung und damit Aktivierung des Substrats durch Ladungsverschiebung, braucht hier nicht eingegangen werden.

Weil die Co-Enzyme bei einer bestimmten Reaktion identisch sind, glaubte man lange Zeit, daß auch das Apoferment einer bestimmten Reaktion immer gleich gebaut ist. WARBURG und CHRISTIANSEN (55) erwähnten 1943 erstmals, daß sich die Aldolase der Hefezelle von der Aldolase des Skelettmuskels unterscheidet. Erstere benötigt Zink zur Wirkung, letztere wird durch Zink gehemmt.

Ein weiterer Schritt war die Auffindung von verschiedenartigen Enzymen für die gleiche Reaktion in demselben Gewebe. J.B. NEILAND (42) (43) beobachtete 1952 erstmals, daß die Lactatdehydrogenase des Rinderherzens aus zwei Komponenten besteht.

Nach T.WIELAND und G.PFLEIDERER (58) werden physikalisch, chemisch und biologisch unterscheidbare Proteine gleicher biologischer Wirkung, aber verschiedener Herkunft *d i f f e r e n t e* Enzyme genannt.

Enzyme derselben Herkunft können ebenfalls aus mehreren sehr ähnlichen, aber unterscheidbaren Proteinen bestehen. Sie werden als *m u l t i p l e* Formen oder als Isoenzyme bezeichnet.

Isoenzyme können auf Grund der Variation im Bau des Apoferments, also anhand der verschiedenen Größe und Ladung des Eiweißkörpers, durch Elektrophorese oder Austauschchromatographie getrennt werden. Sephadex-Ionenaustauscher eignen sich wegen ihrer hohen Belastbarkeit besonders gut für diesen Zweck.

2. Allgemeines über die Aldolase

Die Aldolase ist ein zentrales Ferment der Glykolyse. Sie spaltet Fructose-Diphosphat (FDP) in Glycerinaldehyd-Phosphat (GAP) und Dioxyaceton-Phosphat (DAP). Zwischen den beiden Triosen besteht ein Gleichgewicht, das zu etwa 96% auf der Seite des DAP liegt. Infolge des raschen Abbaus des GAP durch die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH = Warburgsches oxydierenden Gärungsferment) wird dieses aber mit Hilfe der Trioseisomerase (TIM), immer wieder aus Dihydroxyaceton-Phosphat nachgebildet.

MEYERHOF und LOHMANN entdeckten 1934 die Aldolase (3) (Zymohexase). Sie kristallisierten das Ferment erstmals aus Rattenmuskeln. Die Muskelaldolase enthält im Gegensatz zur pflanzlichen Aldolase, die Zink benötigt, keine Schwermetalle, sondern braucht zur Wirkung freie SH-Gruppen (11). Ihre Umsatzzahl ist gegenüber anderen Gärungsfermenten mit 7000 Grammolekülen FDP/Minute relativ klein.

Besonders aldolasehaltige Gewebe sind die Skelettmuskulatur, die Leber und die Erythrozyten (55). Nach einer Übersicht von F.W. SCHMIDT (51) weist auch die Großhirnrinde eine beachtliche Aldolaseaktivität auf.

Klinisch hat die Bestimmung der Serumaldolase eine große Bedeutung erlangt. Ihre Aktivitätserhöhung ist an eine akute Schädigung des aldolasehaltigen Gewebes oder an eine Ausscheidungsverringerung über die Leber gebunden.

So ist die Aktivität erhöht bei akuter Hepatitis (nicht aber bei chronisch-latenter Hepatitis), Stauungsikterus, Lebercirrhose(6), bei progressiver Muskeldystrophie (Typ Erb), nicht aber bei anderen dystrophischen

Myopathien einschließlich Poliomyelitis und Muskeldystrophie nach Nervendurchtrennung (18) (9) und beim akuten Myocardinfarkt, bei dem neben der Aldolase auch die CPK, GOT und LDH im Serum erhöht nachgewiesen werden.

3. Allgemeines über Phosphatasen

Die Phosphatasen werden zu der großen Gruppe der Hydrolasen gerechnet. Sie spalten die Esterbindung zwischen Phosphorsäure und Alkohol unter Aufnahme von einem Molekül Wasser auf. Wir kennen eine große Zahl von für bestimmte Substrate spezifische Phosphatasen.

Charakteristika und Daten über die hier untersuchte Saure und Alkalische Phosphatase anzugeben wäre unnütz, weil ja gerade versucht werden soll, multiple Formen mit zwar gleicher biologischer Wirkung, aber verschiedenen Eigenschaften zu finden.

1955 konnten A.J. EMERY und A.L. DOUNCE (14) zwei verschiedene Alkalische Phosphatasen, von denen nur eine durch Mg aktivierbar ist, feststellen. Die aktivierbare Phosphatase befindet sich hauptsächlich im Plasma. Die nichtaktivierbare ist vor allem im Zellkern lokalisiert und macht etwa 20% aus.

D. ROGERS und F.J. REITHEL (48) erhielten bei Chromatographie an DEAE-Cellulose und Gradientenelution mit NaCl drei Aktivitätsgipfel für die Saure Phosphatase. Danach besitzen die Phosphatasen an verschiedenen Substraten verschiedene Wirksamkeit.

Nach A.L. GROSSBERG (17) besteht die Alkalische Phosphatase in Niere und Darm aus 3-4 Komponenten. In Leber und Milz wurden von der 2. Komponente nur wenige % gefunden.

REITH und E. und F.W. SCHMIDT (46) wiesen 1964 in der menschlichen Leber, wie schon MOORE und ANGLETTI (40) in der Rattenleber, vier Isoenzyme der Sauren Phosphatase nach. Das Verteilungsmuster der Isoenzyme der Rattenleber, also

der prozentuale Gehalt der Fermente, unterschied sich deutlich von dem der Menschenleber.

Nachdem es G.JUNG und Mitarbeitern (22, 23, 24) gelungen ist, im Ovar, speziell im Liquor folliculi, Protein-
asen und Phosphatasen nachzuweisen, interessiert es, ob sich ebenso, wie in anderen Geweben auch hier die Aktivität aus mehreren Komponenten zusammensetzt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den multiplen Formen der Alkalischen und Sauren Phosphatase im Ovar von Schweinen.

II. METHODIK

A. Aldolase

1. Die Stickstoffbestimmung

Zur Objektivierung der in den Homogenaten gefundenen Fermentaktivitäten wurde diese auf Milligramm Stickstoff bezogen. Die Bestimmung des Stickstoffs erfolgte nach KJELDAHL mit einer von BEET beschriebenen Modifikation (3).

2. Die Fermentgewinnung

Die zu untersuchenden Ovarien wurden dem frisch geschlachteten Schwein direkt entnommen, in einem eisgekühlten Behälter transportiert und innerhalb von 2 Stunden unter Kühlung sämtlicher Geräte und verwendeten Lösungen aufgearbeitet.

a) Liquor folliculi

Die Follikel wurden mit einer Spritznadel punktiert, und der Liquor mit einer Wasserstrahlpumpe in einen Erlmeyerkolben gesaugt.

Die Punktion erfolgte nach Follikelgröße.

Follikel mit dem Durchmesser von

1 - 3 mm	galten als kleine
4 - 5 mm	als mittelgroße
6 - 8 mm	als große und
üb. 8 mm	als sehr große Follikel.

Die gewonnenen, gelblich-serösen Flüssigkeiten wurden noch 30 Minuten bei 30 000 Umdrehungen/Min. in der Spinco-Ultrazentrifuge von Beckmann Modell L mit Rotor Nr. 40 geschleudert, um angesaugte Erythrocyten und Bindegewebssteile zu sedimentieren.

Zur Fermentbestimmung mußte der Überstand noch mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden.

b) Gewebshomogenat und Zellfraktionierung

Nach Herauspräparation der Corpora lutea und rubra aus dem umgebenden Bindegewebe wurden diese mit einer Schere zerkleinert und in einem Glashomogenisator nach POTTER und ELVENHEJEM (45) in eisgekühlter 30% Rohrzuckerlösung im Verhältnis 1 : 3 homogenisiert. Um das Homogenat von Bindegewebsresten zu befreien, wurde es durch ein Spezialfiltertuch gepreßt. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung des Homogenats mit Rohrzuckerlösung im Verhältnis 1 : 4.

Bei der Zellfraktionierung wurde nach der Methode von LANG und SIEBERT (30), ergänzt von HOOGEBOOM, SCHNEIDER und PALADE (20) vorgegangen. Umseitig sei ein Schema von G.JUNG (25) wiedergegeben.

Das Waschen der Kerne und Mitochondrien erfolgte ebenfalls mit 30%-iger Rohrzuckerlösung. Die für die Bestimmung notwendige weitere Verdünnung geschah mit physiologischer NaCl.

3. Die Mitochondrienvorbereitung zum optischen Test:

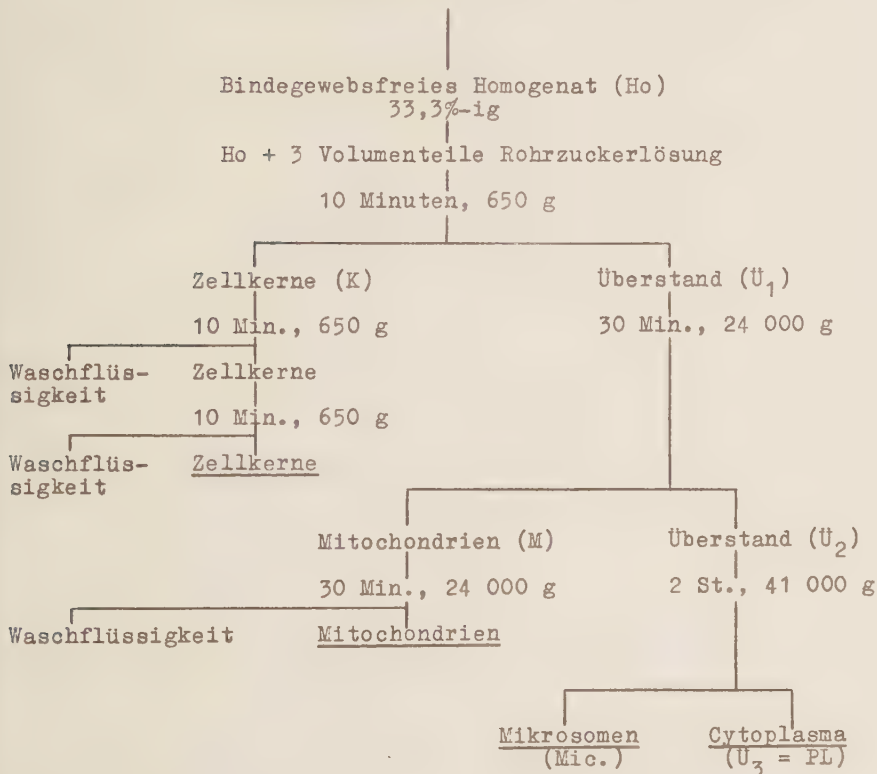
Da mit einem optischen Test gearbeitet wurde, war es nötig, das trübe, in physiologischer NaCl aufgelöste Mitochondriensediment lichtdurchlässig zu machen.

Nach einer Vorschrift von K.H.BÄSSLER (1) gibt man 0,1 ml 4% Triton X-100 zu einem ml Mitochondriensuspension (etwa 10 - 21 mg Protein), mischt gut durch und läßt einige Minuten stehen.

Die trübe Suspension wird dadurch klar und durchsichtig und kann nun im optischen Test verwendet werden.

Schema der Zellfraktionierung, entnommen aus
der Habilitationsarbeit von G.JUNG (Tübingen)
S. 48.

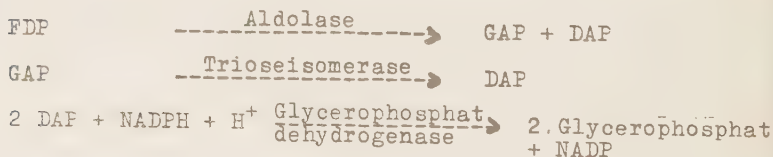
1. Präparation des Gewebes
2. Einwiegen des Gewebes
3. Zerkleinerung mit der Schere
4. Homogenisieren mit 2 Volumenteilen 30%-iger
Rohrzuckerlösung
5. Hindurchpressen durch ein Spezialfiltertuch



4. Die Aldolasebestimmung

In der Literatur werden fünf Methoden zur Aldolasebestimmung angegeben:

- a) MEYERHOF und LOHMANN (37) (39) bestimmten das alkalihydrolysierbare Phosphat des aus FDP gebildeten Triosephosphat.
- b) DOUNCE und BEYER (13) oxydierten und decarboxylierten Triosephosphat in konzentrierter Schwefelsäure zu Acetaldehyd und bestimmten diesen.
- c) WARBURG und CHRISTIANSEN (55) fanden einen spektrophotometrischen Test, bei dem GAP das NADP in Gegenwart kristalliner Triosephosphatdehydrogenase und Arsenat reduziert. Die daraus resultierende Zunahme der Absorption bei 340 oder 366 $m\mu$ durch das gebildete $\text{NADPH} + \text{H}^+$ kann gemessen werden.
- d) Die heute noch am häufigsten verwendete Methode von SIBLEY und LEHNINGER (52) besteht in einer Reaktion zwischen Triosephosphat und 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Das Reaktionsprodukt zeigt in alkalischem Milieu eine rote Farbe mit einem Absorptionsmaximum zwischen 535-540 $m\mu$.
- e) Die von HINDSBERG (19) erwähnte und von LUDWIGSEN (33) ausgearbeitete Methode einer gekuppelten Enzymreaktion, mit spektrophotometrischer Messung des $\text{NADPH} + \text{H}^+$ - Verbrauchs.



Die Abnahme von $\text{NADPH} + \text{H}^+$, gemessen durch die Abnahme der Absorption bei 366 oder 340 $m\mu$, ist ein

Maß für die Aldolaseaktivität.

Die Bestimmungen nach LOHMANN und MEYERHOF und die Bestimmungen nach DOUNCE und BEYER sind für große Untersuchungen zu umständlich. Das System von WARBURG und CHRISTIANSEN ist empfindlich gegen die Gegenwart von Trioseisomerase und kann deshalb nur bei gereinigten Aldolasepräparaten angewendet werden. Bei der Methode nach LEHNINGER fällt die Reaktionsgeschwindigkeit nach 2 Minuten Testdauer ab, sodaß kein gleichmäßiger Reaktionsablauf gewährleistet ist. Für die Methode von LUDWIGSEN sprach die Leichtigkeit der Durchführung und die Genauigkeit des Testes.

Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurde also die Methode von HINDSBERG und LUDWIGSEN verwendet, die sich als Aldolase UV-Test der Firma BOEHRINGER in Form einer einfachen Testkombination im Handel befindet.

Im Eppendorf-Photometer werden in 10 mm Küvetten mit einem Fassungsvermögen von 3 ml pipettiert:

2,75 ml Collidinpuffer pH 7,4; 0,056 M
Monojodacetat 0,0003 M
Fruktosediphosphat 0,002 M

0,05 ml NADPH + H^+ 0,015 M, aufgelöst in 1%
Natriumbikarbonat

0,01 ml Glycerophosphatdehydrogenase (GDH) + TIM

0,20 ml Fermentlösung

Zur genaueren Zeiteinhaltung und zur Vermeidung von Abkühlung durch Umschüttung wurden die Küvetten mit dem Testansatz während der ganzen Messung in der, durch Thermostat auf 37 Grad einregulierten Küvettenfassung des Photometers belassen.

Für jede Bestimmung muß ein Leerwert mit 0,20 ml Fermentlösung und 2,80 ml physiologischer Kochsalzlösung angesetzt werden. Gegen diesen Leerwert wird die Extinktion des Reaktionsgemisches bei 340 oder 366 $m\mu$ nach 5 und 25 Minuten gemessen. Die Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2 = \Delta E$

ist proportional der Enzymaktivität.

Gemäß der International Union of Biochemistry (Report of the Commission on Enzymes 1961 (47)) wird eine Internationale Einheit definiert als die Enzymmenge, die bei 25 Grad Celsius in einer Minute 1 Mol Substrat umsetzt. Eine Millieinheit (ME) ist ein tausendstel einer Einheit. Die Enzymaktivität wird auf 1 ml Untersuchungsmaterial bezogen. Zur Umrechnung von Millieinheiten in die noch gebräuchlichen BÜCHER-Einheiten wird mit dem Faktor 0,055 multipliziert. Der molare Extinktionskoeffizient von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ bei 366 m μ ($3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$), ein Temperaturkoeffizient von 12% pro Grad und der Einsatz von 0,2 ml Fermentlösung bei einem Testvolumen von 3 ml ergeben unter den gegebenen Reaktionsbedingungen einen Faktor von 46,8 zur Umrechnung der Extinktionsdifferenz in Millieinheiten.

$$E_{366 \text{ m}\mu} \cdot 46,8 = \text{Millieinheiten/ml}$$

Der Test ist mit einem sehr geringen Fehler behaftet ($\pm 3\%$), weil sowohl die $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -, die GDH-TIM-, als auch die Puffer-Konzentration, von einer bestimmten Mindestkonzentration an keinen Einfluß mehr auf die Reaktionsgeschwindigkeit besitzen. Die bei den kleinen Mengen auftretenden Pipettierfehler haben also keinen Einfluß auf das Ergebnis. Einzig die Veränderung der Substratkonzentration hat eine Schwankung der Aktivitätswerte zur Folge (10). Bei der Menge von 2,75 ml ist der Pipettierfehler aber hier recht gering.

B. Phosphatasen

=====

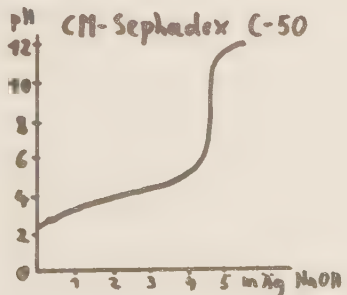
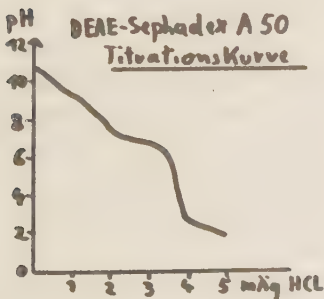
1. Die Fermentgewinnung

Der Transport der Ovarien und die Zerkleinerung erfolgte wie schon beschrieben. Dagegen fand die Homogenisation in 0,2 M Essigsäure-Acetat-Puffer pH 9 oder in 0,2 M NaOH-Glycokol-Puffer pH 9 im Verhältnis 1 : 3 statt. Anschließend wurde das Homogenat in der Ultrazentrifuge (Modell Spinco im Läufer 40/B) 30 Minuten bei 30 000 Umdrehungen pro Minute geschleudert, um das Plasma von Bindegewebsresten, Kernen, Mitochondrien und Mikrosomen zu befreien. Jeweils 5 oder 10 ml reines Plasma wurden an den Sephadex-Ionenaustauschern der Deutschen Pharmacia GmbH Frankfurt a.M. fraktioniert.

2. Sephadex-Ionenaustauscher und ihre Vorbereitung

Sephadex besteht aus einem Gerüst quervernetzter Dextranketten. Die funktionellen Gruppen sind durch Verätherung an die Glucosereste der Polysaccharidketten gebunden.

Bei dem zur Fraktionierung der Sauren Phosphatasen bei pH 5 verwendeten CM Sephadex C 50 handelt es sich um Carboxymethyläther. Seine Beladekapazität für



Hb wird bei pH 6,5, nach Äquilibrieren mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer, mit 4,7 g/g Sephadex angegeben.

CM Sephadex C 50 ist am wirksamsten bei pH-Werten über pH 5-4 (siehe Titrationskurve). Für die Chromatographie von Proteinen ist es wegen seiner hohen Austauschkapazität von 4-5 mÄq/g besonders geeignet.

Zur Fraktionierung der Alkalischen Phosphatase bei pH 9 war DEAE Sephadex A 50 coarse der beste zur Verfügung stehende Austauscher. Seine funktionellen Gruppen bestehen aus Diaminoäthylester, seine Totalaustauschkapazität beträgt 3-4 mÄq/g.

Nach Quellen des Austauschers (ca. 12 Stunden) und Dekantieren kleinster Partikel wird das Gel auf einem Faltenfilter mit 0,5 n HCl (DEAE Sephadex A 50) bzw. mit 0,5 n NaOH (CM Sephadex C 50) und anschließend mit Wasser gewaschen. Dann folgt die Behandlung mit dem entgegengesetzten Elektrolyten, Nachwaschen mit Wasser und Äquilibrieren mit dem für den Versuch notwendigen Puffer.

Durch mehrfaches Dekantieren und Wiederauffüllen mit Puffer in kurzen Zeitabständen werden die leichteren Dextranbruchstücke ausgespült. (5⁴) Durch diese Manipulation kann die spätere Tropfgeschwindigkeit der Säule reguliert werden.

Für die mit Eiswasser gekühlte Säule von 7 mal 220 mm wurden etwa 4 g Ionenaustauscher benötigt. Das Gelbett wurde, um ein Aufwirbeln der Gelkörner zu verhindern, oben mit einem Stück Filterpapier abgeschlossen. Die Elution erfolgte diskontinuierlich mit steigender NaCl-Konzentration (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0), nachdem das nichtgebundene Eiweiß mit Puffer herausgespült worden war. Vom Puffer wurden 70, von den NaCl Gradienten 50 ml verwendet.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug zwischen 3-10 Tropfen pro Minute. Mittels eines automatischen Fraktionskollektors wurde das Eluat in Fraktionen zu 7 ml aufge-

fangen und bis zur Aktivitätsbestimmung im Kühlschrank aufbewahrt.

3. Die Proteinbestimmung:

Die Proteinbestimmung erfolgte nach WARBURG und CHRISTIANSEN (55) durch Absorptionsmessung bei 280 $m\mu$ im Zeiss-Spektrophotometer Modell PMQ II. Die Absorption beruht auf der Anwesenheit der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, die in den verschiedenen Proteinen nur gering variieren.

Proteinkonz. (mg/ml) = $F \cdot \frac{1}{d} \cdot \text{Opt. Dichte bei } 280 \text{ } m\mu$

d = Länge des Lichtwegs in cm

F = Faktor, der Fehler durch die Beimengung von Nucleinsäuren ausschaltet. Bei reinem Protein beträgt er 1,116.

Nucleinsäuren adsorbieren sehr stark bei 260 $m\mu$, weniger stark bei 280 $m\mu$. Die Beimengung von Nucleinsäuren kann deshalb durch zusätzliche Messung bei 260 $m\mu$ bestimmt und ihre Interferenz eliminiert werden. Der Faktor kann dann auch aus einer Tabelle entnommen werden (zum Beispiel: Methods of Encymologie Band III S.451).

Bei kleineren Meßwerten wurde nach C.FORREST und G. und D.DOHERTY (15) ein Faktor von 1,0 angenommen, was einer Nucleinsäurebeimengung von etwa 1% entspricht. Zur Kontrolle wurde von jedem Homogenat eine Kjeldahlbestimmung in der schon beschriebenen Weise durchgeführt.

4. Die Phosphatase-Aktivitätsbestimmung:

a) Die Saure Phosphatase: Ihre Bestimmung erfolgte nach M.LONDON und B.P.HUDSON (32).

4 ml Substratpuffer
1 ml Fermentlösung

Inkubation 60 Minuten bei 37 Grad Celsius

1 ml 30% Trichloressigsäure

Der Essigsäure-Acetat-Puffer besteht aus:

- 1 Teil 0,2 M Essigsäure
- 2 Teilen 0,2 M Natriumacetat

Der Substratpuffer setzt sich zusammen aus:

- 80 ml 0,2 M Essigsäure-Acetat-Puffer
- 410 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 500 mg $\text{Na}_2\text{-}\beta\text{-Glycerophosphat}$
mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt

b) Die Alkalische Phosphatase:

Die Bestimmung erfolgte nach H.D.JENNER und H.D.KAY
(21)

- 5 ml Substratpufferlösung
- 1 ml Fermentlösung
- Bebrüten 60 Minuten bei 37 Grad
- 2 ml 15% Trichloressigsäure zum Enteiweißen

Der NaOH-Glykol-Puffer besteht aus:

- 12,4 Teilen 0,2 M NaOH
- 87,6 Teilen 0,2 M Glycokol

Der Substratpuffer enthält:

- 1 Teil 2,5% Na β -Glycerophosphat
- 5 Teile 0,2 M NaOH-Glycokol-Puffer

c) Bestimmung des abgespaltenen Phosphats:

Nach K.LOHMANN und L.JENDRASSIK (31) werden in ein
25 ml-Kölbchen pipettiert:

- 2 ml des zentrifugierten Ansatzes
- 5 ml Ammoniummolybdat (2,5% in 5 M H_2SO_4)
- 1 ml Amidol

- Nach Auffüllen mit aqua dest. auf 25 ml
- 7 Minuten in ein Wasserbad von 37 Grad
- 7 Minuten in ein Wasserbad von 25 Grad

Die Intensität der blauen Farbe wird am Elektrophotometer von Zeiss, Modell Elko II, bei Filter J 61,7 innerhalb von 20 Minuten gegen einen Leerwert gemessen. Außerdem muß durch einen O-Wert das freie Phosphat in jeder Probe bestimmt werden.

Die Differenz, Extinktionswert der Probe weniger O-Wertextinktionen, ist ein Maß für die abgespaltene Phosphatmenge. Nach der mit KH_2PO_4 von E.KIDESS (28) (Dissertationsarbeit) am selben Gerät aufgestellten und später mehrmals nachgeprüften Eichkurve entsprechen 0,300 Extinktion einer Phosphatmenge von 68,5 μ g Phosphat pro ml.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

=====

A. Aldolase

1. Der Aldolasetest

In seiner Testvorschrift gibt BOEHRINGER an, daß keine Extinktionsdifferenzen über 0,250 entstehen dürfen, weil sonst kein linearer Reaktionsablauf garantiert werden kann. Betrachten wir aber die Kurve der 5- und 25-Minutenwerte der Absorption von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ gegen Wasser in Abhängigkeit von der Fermentaktivität, so sehen wir, daß bei größer werdender Aktivität nach anfänglich größeren Differenzen (II) wieder ein Bereich auftritt, in dem die Differenz, wie im Test vorgeschrieben, unter 0,250 sinkt (III). Es wird irrtümlicherweise eine zu niedrige Aktivität angegeben. (S. Abb.1 S.19)

Arbeitet man mit Gewebe sehr hoher Aldolaseaktivität und verdünnt das Homogenat ungenügend, so kann es vorkommen, daß beinahe alles zugegebene $\text{NADPH}+\text{H}^+$ bei der ersten Absorptionsmessung nach 5 Minuten oxydiert worden ist (Abb.2). Da die Absorption bis zur Messung nach 25 Minuten nur gering abnehmen kann, entsteht fälschlicherweise der Eindruck, das Gewebe besitze eine sehr niedrige Aktivität. Es besteht aus Mangel an $\text{NADPH}+\text{H}^+$ keine Proportionalität mehr zwischen $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Verbrauch und Aldolaseaktivität. (S. Abb.2 S.19)

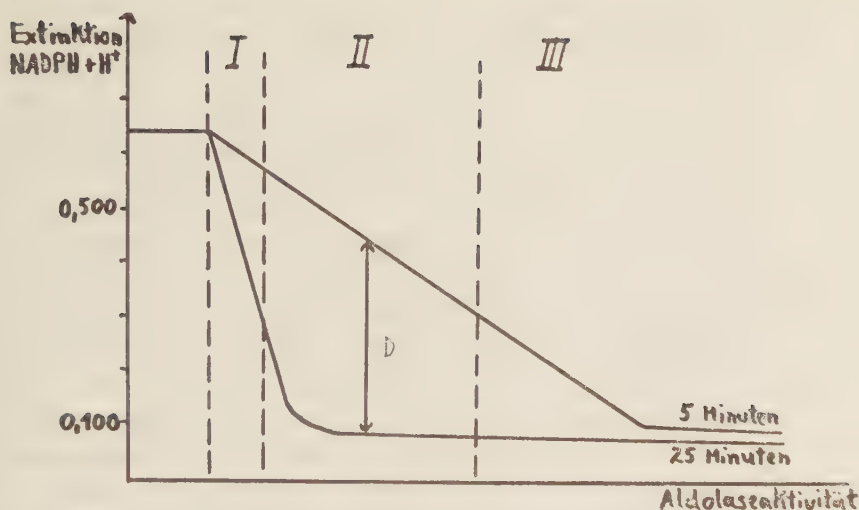


Abb. 1: NADPH+H⁺-Absorption nach 5 und 25 Minuten Testdauer in Abhängigkeit von der Fermentaktivität.

- Teil I = Vorgeschriebener Testbereich
 Teil II = Falscher Bereich, keine Proportionalität zwischen NADPH+H⁺-Verbrauch und Aktivität
 Teil III = Scheinbar richtiger Testbereich
 D = Gemessene Extinktionsdifferenz zwischen 5- und 25-Minutenwert

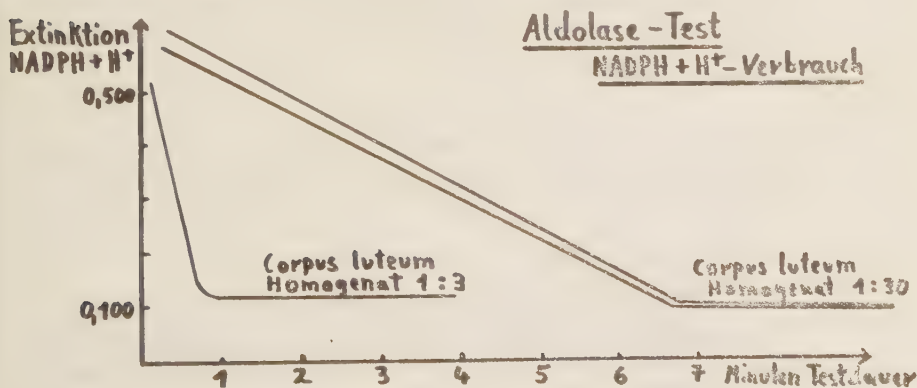


Abb. 2: NADPH+H⁺-Absorption in Abhängigkeit von der Testdauer bei hoher Aldolaseaktivität. Fast alles DPNH+H⁺ ist nach 5 Minuten oxydiert worden.

Nimmt bei Verwendung konzentrierterer Lösungen die Absorptionsdifferenz nicht zu, sondern ab, so liegt dieser Fall vor.

Nun konnte aber festgestellt werden, daß die Absorption von 0,05 ml $\text{NADPH} + \text{H}^+$ einer frischen Testkombination in 2,95 ml Wasser gegen Wasser etwa 0,660 beträgt.

Wird also in den ersten 5 Minuten, einer Extinktion von 0,200 entsprechend, $\text{NADPH} + \text{H}^+$ abgebaut, so steht bei gleichbleibendem Abbau, wie man aus der Kenntnis der Absorptionsszahl 0,660 ersieht, für weitere 20 Minuten nicht genug $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zur Verfügung (weitere 0,800).

Rein theoretisch läßt sich daher errechnen, daß die von BOEHRINGER als maximale Extinktionsdifferenz festgesetzten 0,250 erreicht werden, wenn in den ersten 5 Minuten die Extinktion um 0,062 abnimmt. Das entspricht einem 5-Minutenwert von etwa 0,600. Werte darüber liefern mit Sicherheit das richtige Ergebnis.

Werte unter 0,600 entstehen, wenn die Fermentaktivität zu groß ist, wie in dem vorher beschriebenen Fall, oder wenn das $\text{NADPH} + \text{H}^+$ der Testpackung schon teilweise oxydiert ist. Ob die Messung trotzdem als richtig gelten darf, kann schnell errechnet werden, wenn vor jeder Meßreihe die Extinktion von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ gegen Wasser, wie oben beschrieben, bestimmt wird.

Wichtig ist also, daß bei Kenntnis der $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -Absorption gegen Wasser anhand des 5-Minutenwertes ausgesagt werden kann:

1. Ob das Ergebnis verwertet werden darf
2. Ob das Ferment in der rechten Verdünnung für den Meßvorgang vorliegt. Es kann also ohne den Zeitverlust der gesamten Messung schon nach 5 Minuten der Test abgebrochen werden und mit größerer Verdünnung wiederholt werden.

Aus Abbildung 2 ist ferner zu ersehen, daß ein linearer $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -Abbau bis zu einer Extinktion von etwa 0,150

stattfindet. Es können deshalb in Ausnahmefällen auch Differenzen von über 0,250 zur Auswertung herangezogen werden, wenn der 25-Minutenwert nicht zu nahe an diesem Endpunkt der linearen Reaktion liegt.

Alle diese Probleme treten nicht auf, wenn der Test nur für die Bestimmung der Serumaldolase verwendet wird. Bei Normalwerten im Serum von 1-2 Millieinheiten und pathologischen Werten von selten über 20 Millieinheiten wird kaum Teil II, nie Teil III der Kurve in Abb. 1 erreicht. Anders liegt der Fall dagegen in Gewebshomogenaten, die ein vielfaches der Serumaktivität aufweisen. Hier ist die rechte Verdünnung oft schwer zu finden und die Kenntnis dieses Testmechanismus zur richtigen Auswertung unbedingt erforderlich.

2. Aldolase im Liquor folliculi:

Bei der Bestimmung der Aldolaseaktivität im Liquor, getrennt nach kleinen, mittleren, großen und sehr großen Follikeln, erhielten wir folgende Ergebnisse.

	ME/ml	mg N/ml	Bücher- E./ml	Bücher- E./mgN
Kleine Follikel 1-3 mm (4 Versuche)	109,1	7,85	6,0	0,766
Mittlere Follikel 4-5 mm (3 Versuche)	72,2	7,42	3,97	0,535
Große Follikel 6-8 mm (4 Versuche)	36,6	8,54	2,01	0,235
Sehr große Follikel über 8 mm (3 Vers.)	18,4	9,75	1,01	0,103

Die Aktivität der Aldolase ist umgekehrt proportional der Follikelgröße. Die kleinsten Follikel weisen die höchste Aktivität auf.

3. Versuche mit Triton X-100:

Zu je 10 ml einer verdünnten kristallinen Aldolasesuspension wurden 1 ml 4%-iges Triton X-100, ein Netzmittel vom Typ eines polymeren p-Isooktylpolyoxyäthylens, oder 1 ml physiologische NaCl gegeben und die Aktivität verglichen.

Extinktion ohne Triton:	0,206 (6 Versuche)
Extinktion mit Triton:	0,199 (3 Versuche)

Eine leichte Hemmung durch Triton ist nicht signifikant und wird im Folgenden nicht berücksichtigt. Da die Mitochondriensuspension zur Bestimmung noch im Verhältnis 1 : 3 verdünnt wurde, lag außerdem eine noch niedrigere Tritonkonzentration als im Testversuch vor.

Vergleichende Messungen mit Mitochondrien ohne und mit Triton X-100 ergaben sogar eine um 8% höhere Aktivität, wenn Triton vorhanden war.

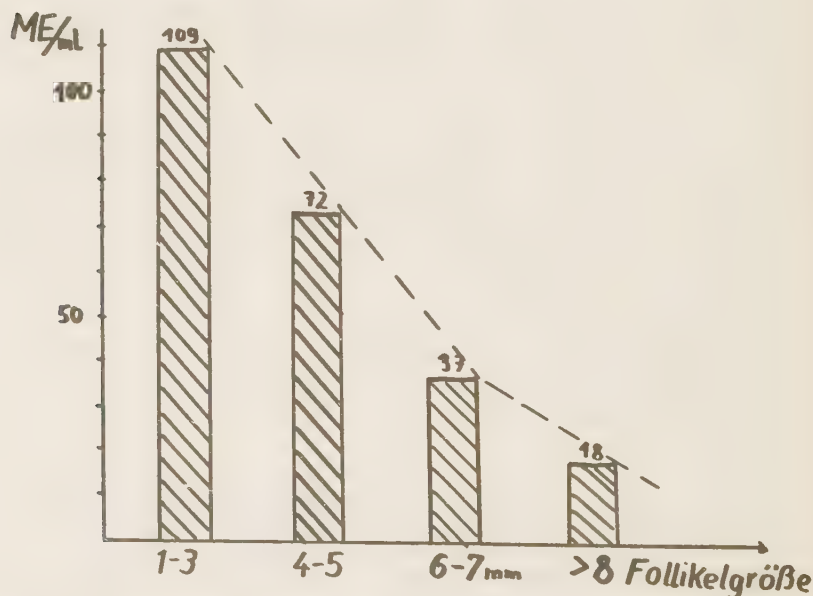


Abb. 3: Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Aktivität und Follikelgröße

3. Zellfraktionierung des Corpus luteum

Die Aktivitätsangaben und der Stickstoffgehalt pro ml beziehen sich hier, ebenso wie bei der Fraktionierung des Corpus rubrum, auf ein Homogenat der Verdünnung 1 : 12. Es wurden die folgenden Werte erhalten.

	ME/ml	In %	mg N/ml	In %
Homogenat	93,3	100,0	1,25	100,0
Kerne	3,18	3,4	0,074	5,93
Mitochondrien	25,4	27,2	0,209	16,7
Mikrosomen	5,85	6,3	0,063	5,05
Plasma	50,0	53,7	0,908	72,6
Summe:	84,43	90,6	1,254	100,28

Tabelle 2: Verteilung von Aktivität und Stickstoff auf die einzelnen Zellfraktionen des Corpus luteum (Mittelwert aus 4 Versuchen)

Trotz sorgfältigstem Arbeiten gelang es nicht, bei Ad-dieren der einzelnen Fraktionen die ganze Aktivität des Homogenats wiederzugewinnen.

Im Plasma (53,7%) und in den Mitochondrien (27,2%) ist der größte Teil der Aldolaseaktivität lokalisiert. Auch fällt der hohe Stickstoffgehalt der Mitochondrienfraktion (16,7%) auf. Trotzdem finden wir in den Mitochondrien die höchste spezifische Aktivität von 123 ME/mg N.

4. Zellfraktionierung des Corpus rubrum

Die Fermentverteilung gleicht der des Corpus luteum. Allerdings ist der Stickstoff und die Aktivität des Plasmas auf Gunsten der Mitochondrienfraktion erhöht.

	ME/ml	In %	mg N/ml	In %
Homogenat	83,5	100,0	1,315	100,0
Kerne	1,1	1,3	0,0775	5,9
Mitochondrien	15,1	18,1	0,1565	11,8
Mikrosomen	5,43	6,5	0,0565	4,3
Plasma	63,0	75,4	1,080	82,2
Summe:	84,63	101,3	1,3705	104,2

Tabelle 3: Verteilung von Stickstoff und Aktivität auf die einzelnen Zellfraktionen des Corpus rubrum. (Mittelwert aus 3 Versuchen).

Auch hier besitzen die Mitochondrien mit 96,5 ME/mg N die höchste spezifische Aktivität.

5. Die spezifische Aktivität von Corpus luteum und rubrum

Wie sich aus Tabelle 2 errechnen läßt, beträgt die spezifische Aktivität des Homogenats, also die Aktivität pro mg Stickstoff, im Corpus luteum 74,5 ME/mg N.

Wurde in physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert (1 : 3) und anschließend in der beschriebenen Ultrazentrifuge bei 30 000 U/Min, 30 Minuten geschleudert, so ergab sich die ungleich höhere spezifische Aktivität von 320,7 ME/mg N, also über das 4-fache.

Ähnlich liegt der Fall beim Corpus rubrum. Statt 63,5 ME/mg N wurden 139,5 Einheiten gefunden, also über das Doppelte. Da bei 30 000 Umdrehungen/Min. geschleudert worden war, müßten diese Werte eigentlich denen des reinen Plasmas entsprechen. Hier fällt der Vergleich noch schlechter aus.

	ME/ml	mgN/ml	ME/mg N	Bücher E./mg Protein
Corpus luteum Homogenat:	93,3	1,25	74,6	0,66
Plasma:	50,0	0,908	55,0	0,484
NaCl-Ho:	269,0	0,823	327	2,88
Corpus rubrum Homogenat:	83,5	1,31	63,5	0,558
Plasma:	63,0	1,08	58,3	0,513
NaCl-Ho:	127	0,923	137,7	1,21

Tabelle 4: Vergleich der spezifischen Aktivität von Homogenat und Plasma der Fraktionierung und von Homogenat mit physiologischer Kochsalzlösung (3 Versuche).

6. Diskussion

a) Aldolase im Liquor folliculi:

Die Aktivität pro ml Liquor der kleinen Follikel ist mit 109,1 ME/ml im Vergleich zum menschlichen Blutserum (0,2 ME/ml) sehr groß. Die spezifische Aktivität von 13,9 ME/mg N beläuft sich immerhin auf ein Fünftel bis ein Sechstel der bei der Zellfraktionierung gewonnenen spezifischen Aktivität der Corpora lutea aus Schweinsovarien.

Auffallend ist die beinahe lineare Abnahme der Aktivität mit dem Größerwerden der Follikel, ein Ergebnis, das bisher alle im Liquor untersuchten Fermente aufweisen (25).

Der Eiweißgehalt der Follikel ist beinahe konstant. Er weist nur eine leichte Zunahme mit Größerwerden der Follikel auf (7,42 - 9,75 mg N/ml). Wegen des starken Schleuderns in der Zentrifuge ist er gegenüber früheren Angaben etwas niedrig.

b) Zellfraktionierung des Corpus luteum

Der hier gefundene Wert von 27,2% weicht weit von den bisherigen Angaben über den prozentualen Aldolasegehalt der Mitochondrien ab.

A.BOOD (5) fand in Rattengehirnmitochondrien 8-10% der Gesamtaktivität lokalisiert. R.BALAZS (2) beschreibt 12%.

Der hier gefundene hohe Wert widerspricht der bisherigen Meinung, daß es sich bei der Aldolase, wie bei allen Hauptkettenenzymen des Embden-Meyerhof-Cyclus, um ein Typ I-Ferment, das ausschließlich im cytoplasmatischen Raum lokalisiert ist, handelt. Kleine, in Mitochondrien und Kernen gefundene Aktivitäten wurden durch Verunreinigungen infolge ungenügenden Waschens erklärt.

Aber schon B.SACKTOR (50) fand das Ferment Hexokinase und die Fähigkeit der Glucoseverwertung in pflanzlichen Mitochondrien. Neuere Untersuchungen weisen immer größere prozentuale Aldolaseaktivitäten in den Mitochondrien nach. M.K.JOHNSON (26) fand 1960 in einer Fraktion von Kernen, Mitochondrien und großen Mikrosomen des Rattenhirns 28+-3% der Aktivität, in einer weiteren Arbeit (27) 1962 sogar 21% in den Mitochondrien allein lokalisiert.

Nach der bisherigen Definition würde das bedeuten, daß die Aldolase ein Typ III-Ferment ist, also sowohl aus dem M- als auch aus dem C-Raum extrahiert werden kann. CHRISTIE und JUDAH (8) wiesen aber zum ersten Mal für ein Typ III-Ferment bei der Malatdehydrogenase nach, daß die Extrakte der beiden Fraktionen zwar dieselbe Reaktion katalysieren, die Enzyme sich aber in ihren Eigenschaften (Substratsättigung, Umsatzzahl) unterscheiden.

Es handelt sich also um zwei verschiedene Enzyme, nach der Definition von Wieland und Pfeleiderer um multiple Formen des Enzyms oder Isoenzyme.

Nach A.DELBRÜCK (12) besteht auf Grund des Prinzips der eindeutigen cytologischen Lokalisierung biochemischer Eigenschaften (16) kein Typ III, also keine Fermente, die sich sowohl im C- als auch im M-Raum befinden. Sein angeblicher Nachweis ist auf eine mangelnde Charakterisierung des Ferments zurückzuführen.

Tatsächlich konnten bei der Nachprüfung fast immer Isoenzyme entdeckt werden. Allerdings gelang keine eindeutige Zuordnung derselben zu bestimmten Zellräumen (46).

Auf Grund unserer Ergebnisse aus den Mitochondrien des Corpus luteum und auch des Corpus rubrum müssen von der Aldolase ebenfalls Isoenzyme bestehen. Dies wird noch bestätigt durch die Feststellung, daß auch die Kerne bisweilen eine größere Aldolaseaktivität aufweisen. Nach D.B.ROODYN (49) besitzen die Kerne des Rattenleberhomogenats 16,3% der Gesamtaktivität. Er glaubt, daß die Aldolase durch Bindung an die Struktur im Kern festgehalten wird.

c) Zellfraktionierung des Corpus rubrum

In den Zellfraktionen des Corpus rubrum ist eine Verminderung der Mitochondrienaktivität zugunsten des Plasmas zu finden. Auch der Stickstoffgehalt pro ml verändert sich in gleicher Weise.

Zieht man den Aufbau eines Corpus rubrum in Betracht, so ist das wohl verständlich. Von einem Zellmantel umgeben befindet sich im Innern ein aus Thrombocyten, Erythrocyten, Fibrin und Serum bestehendes, rotes, teilweise durch Autolyse schon verflüssigtes Gerinnsel.

Es ist klar, daß damit der Anteil des soliden Gewebes und damit auch der Anteil der Mitochondrien abnehmen muß. Der nicht geringe Aldolasegehalt der Thrombocyten, nach DALE (10) stammen 97% der Blutplasma-Aldolase aus den Blutplättchen, addiert sich, da diese bei der Gerinnung zerstört werden und die Aldolase in den Gerinnseln gebunden wird, nach dem Homogenisieren zur Plasmafraktion.

d) Die spezifischen Aktivitäten:

Die in NaCl-Verdünnung gefundenen spezifischen Aktivitäten der Homogenate von 2,88 Bücher Einheiten/mg Protein beim Corpus luteum und von 1,21 BE/mg Protein beim Corpus rubrum lassen, im Vergleich zu allerdings in menschlichen Geweben gemessenen Werten, eine überdurchschnittliche Aldolaseaktivität vermuten.

Sie sind hinter den aldolasereichen Geweben wie Skelettmuskel (25,7 BE), Großhirn (17,8 BE), Herzmuskel (6,1 BE) und Leber (3,3 BE), aber vor Nebennierenmark (0,9 BE), Uterus (0,5 BE), Lunge (0,5 BE) und Pankreas (0,06 BE) einzuordnen.

Der Grund für die, bei der Zellfraktionierung gefundenen niedrigeren Aktivitäten liegt nicht, wie aus Tabelle 4 hervorgeht, in einem, durch das weniger hohe Zentrifugieren bedingten, größeren Stickstoffgehalt

pro ml. Die Ursache kann vielmehr in der Verwendung von Rohrzucker als Suspensionsmedium und in der Tatsache, daß nach dem Homogenisieren sofort gefiltert wurde, liegen.

Hypertone Rohrzuckerlösung hemmt bekanntlich das Aus-treten von Fermenten aus Zellen und Zellbestandteilen in die Waschflüssigkeit. (Lang und Siebert). Hierdurch und durch die sofortige Filtration wurde Zellresten und nur leicht verletzten Zellverbänden keine Möglichkeit der Dialyse gegeben.

Bei dem Homogenat mit NaCl hingegen verblieben die Zellreste während des Schleuderns in der Zentrifuge, und die Fermente besaßen die Möglichkeit, in das Suspensionsmedium auszutreten.

e) Versuche mit Triton X-100

Die erhaltene höhere Aktivität bei der Bestimmung der Mitochondrien mit Triton X-100 im Vergleich zu Bestimmungen ohne Triton, darf nicht überbewertet werden, weil ein optischer Test zur Bestimmung der Mitochondrienaktivität ohne Triton oder ein anderes Netzmittel eigentlich schon einen Kunstfehler darstellt.

Es ist denkbar, daß ähnlich wie bei den Hydrolasen der Rattenleber, bei der die Enzyme in gebundener, nicht-reaktiver Form in den Mitochondrien enthalten sind und durch eine Konzentration von 0,035% Triton X-100 in Freiheit gesetzt werden (57), die Freisetzung der Aldolase bei diesen Versuchen ebenfalls erleichtert wird.

B. Phosphatasen

Bei der Fraktionierung der Phosphatasen an Sephadex-Säulen ergab sich eine Vielzahl von kleinen Aktivitäten, die oft an der unteren Grenze der Testempfindlichkeit lagen. Messungen unter 1 μ Phosphat/Stunde wurden deshalb gestrichen.

Da das Eluat in relativ großen, 7 ml fassenden Fraktionen gesammelt wurde, fiel ein Aktivitätspeak oft nur auf eine Fraktion. Es ist deshalb wenig sinnvoll, die gemessene Aktivität in Beziehung zur Eiweißmenge zu setzen und eine spezifische Aktivität zu errechnen, weil die Beimengung andersartiger Proteine zu dieser Fraktion unbekannt ist.

Die vorliegende Arbeit gibt deshalb nur qualitative, aber keine quantitativen Ergebnisse.

Um die Bezeichnung der Peaks einfach zu gestalten, werden die Aktivitäten nach ihrem Elutionsmittel (Puffer = I, 0,05 M NaCl in Puffer = II, 0,1 M NaCl in Puffer = III, usw.) und in einem Elutionsmittel nach der Reihenfolge ihres Auftretens bezeichnet.

1. Alkalische Phosphatasen:

a) Homogenat des Gesamtovar vom Schwein

Puffer: Durch reine Elution mit Puffer erschienen in der Hauptproteinzacke und am Ende der Pufferelution in einer weiteren kleinen Proteinzacke 2 große Peaks AI₁ und AI₂.

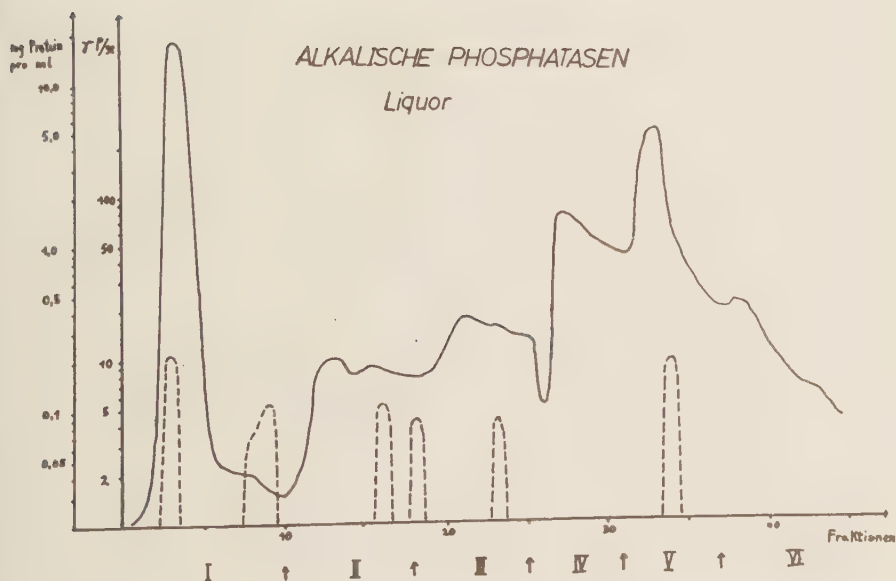
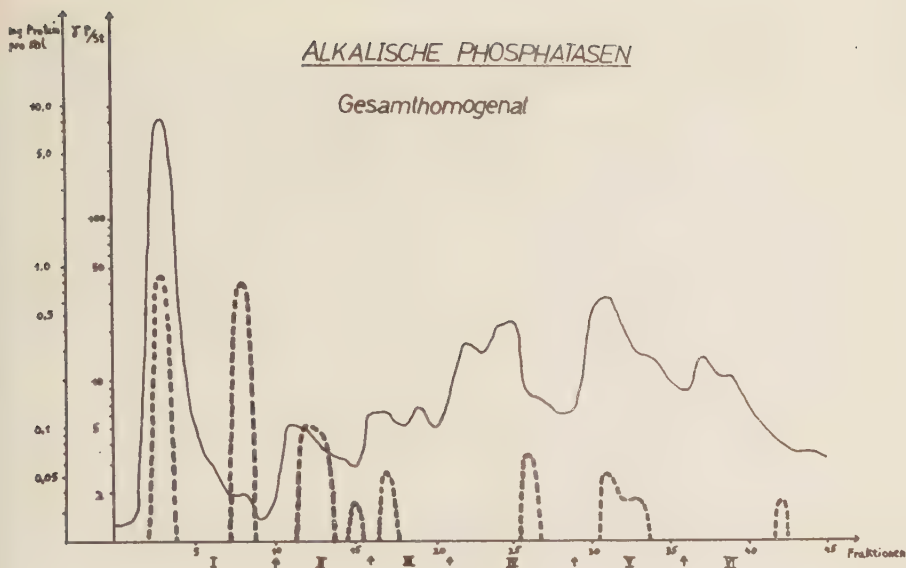
0,05 M NaCl in Puffer:

Auch hier erschienen 2 Aktivitäten, eine große, AII₁, und eine kleine, AII₂.

In den weiteren Gradienten folgte je ein Peak (AIII, AIV, AV und AVI).

b) Liquor folliculi

In Liquor finden wir ein ähnliches Ergebnis. Allerdings ist A III₁, wohl wegen des größeren Proteinausflusses gegen das Ende des 3. Gradienten verschoben. A IV und A VI sind nicht aufzufinden.



2. Saure Phosphatasen

a) Homogenat des Gesamtovar vom Schwein

Puffer: Nur mit 0,2 M Na-Acetat-Essigsäure-Puffer wurden 3 große Peaks erhalten.

S I₁ tritt auf der Höhe des Proteinauslaufs,
S I₂ während dem Abfall des Proteins und
S I₃ am Ende des Auslaufs, noch in den nächsten Gradienten hinüberreichend, auf.

0,05 M NaCl in Puffer: Hier erscheint mit einiger Verzögerung ein großer Peak S II.

0,1 M NaCl in Puffer: In diesem Gradienten tritt am Anfang (S III₁) und am Ende (S III₂) eine Aktivität auf.

0,2 M NaCl in Puffer: Peak S IV₁ erscheint während des maximalen Proteinausflusses, S IV₂ vor Anfang des nächsten Gradienten.

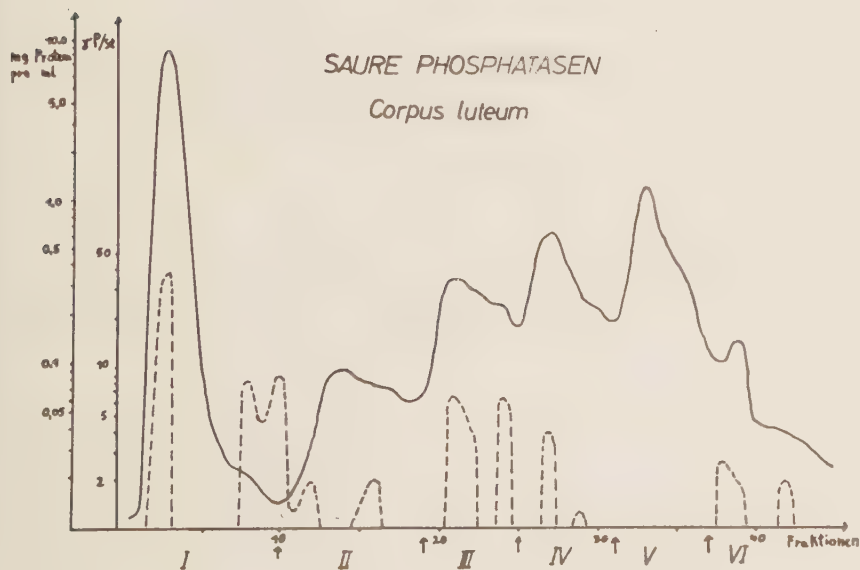
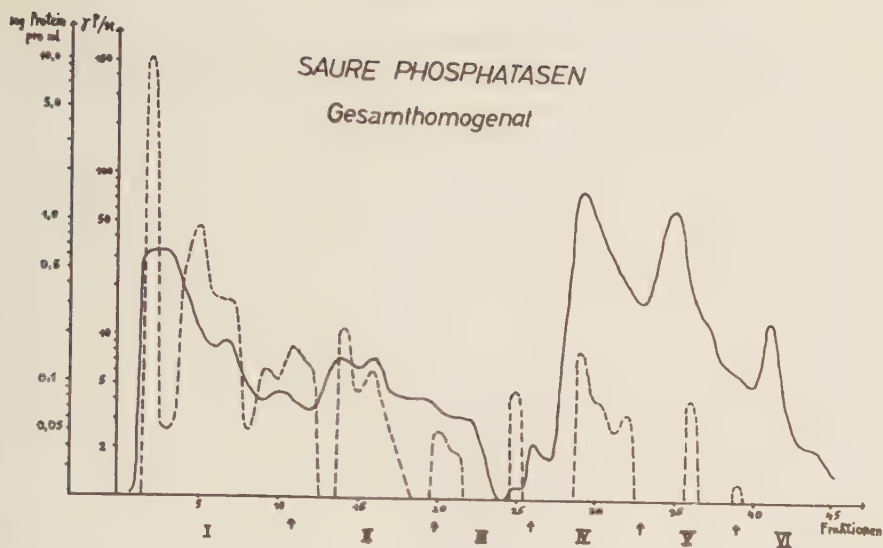
0,5 M NaCl in Puffer: Peak S V erscheint nur im Gesamthomogenat.

1,0 M NaCl in Puffer: Weitere kleine Aktivitätszacken werden festgestellt (S VI₁ und S VI₂).

b) Liquor folliculi

Hier finden wir dasselbe Bild wie im Homogenat, nur erscheint S III₂, das sonst am Ende des Gradienten III zu sehen war, am Anfang des Gradienten IV, allerdings noch vor Anstieg der Eiweißkurve. S V fehlt.

Die Aktivität der Phosphatasen im Liquor ist nach Untersuchungen von G. JUNG, HELD und KIDESS (22) (24) bedeutend geringer als im Gesamthomogenat und im Homogenat des Corpus luteum. Die Peaks sind dementsprechend insgesamt kleiner.



c) Homogenat des Corpus luteum

Auch hier zeigt sich dieselbe Verteilung der Sauren Phosphatase über die Gradienten wie im Homogenat des Gesamtovar. Nur ist S I₂ in S I₃ hineingeschoben. Sie bilden eine doppelgipfelige Zacke. S V fehlt.



3. Erfahrungen mit Sephadex

Bei der Fraktionierung der Sauren Phosphatase mit CM Sephadex C 50 bei pH 5 fällt auf, daß die ersten Fraktionen, die nur durch Spülen der Säule mit Puffer gewonnen werden, sehr eiweißreich sind. Eine Aufschlüsselung der Eiweißkurven zeigt, daß beim Liquor durchschnittlich 85%, beim Homogenat des Corpus luteum 58%, beim Homogenat des Gesamtovar aber nur 11,9 bzw. 21,6% allein durch Puffer herausgespült werden. (Siehe Tabelle über die Bindung des Eiweiß).

Die guten Werte des Gesamthomogenats können durch die geringe, auf die Säule gebrachte Eiweißmenge und die Andersartigkeit des Eiweißes erklärt werden. Es liegt der Schluß nahe, daß die Kapazität des Ionenaustauschers, trotz der hohen Angaben der Hersteller über die hohe Eiweißbindekapazität, überschritten worden ist.

Dies kann nur erklärt werden, wenn die Ionenstärke des Homogenats und des 0,2 M Puffers so hoch liegt, daß die aktiven Gruppen des Austauschers größtenteils abgesättigt werden, sodaß nur noch wenig Eiweiß gebunden werden kann.

Für weitere Untersuchungen empfiehlt es sich deshalb einen Stammpuffer niedrigerer Molarität zu verwenden (etwa 0,05 M) und dann mit steigenden Puffer- und NaCl-Gradienten zu eluieren. Durch die dadurch erreichte kontinuierliche Eiweißausschwemmung könnten die drei Aktivitätsspitzen S I₁, S I₂ und S I₃ weiter getrennt und vielleicht noch aufgeteilt werden. Ein Stammpuffer noch niedrigerer Molarität bringt eine zu starke Schrumpfung des Ionenaustausches während der Elution mit sich.

Der Versuch, dies allein durch Abtrennung der homogenat-eigenen Ionen mittels Gelfiltration an Sephadex G 25 zu erreichen, ist zwecklos. Die Säule enthält, wenn sie mit 0,2 M Puffer äquilibriert wurde, bereits eine über-physiologische Ionenkonzentration.

Um den Einfluß der Puffermolarität auf die Bindekapazität der Säule zu demonstrieren, wurde eine Probesäule

(Nr. 10) gemacht. Nach Äquilibration der Säule mit 0,008 M Essigsäure-Acetat-Puffer begann die Elution mit Puffern der Molarität 0,008, 0,01, 0,02, 0,05 und 0,1 und wurde mit 0,5 und 1,0 M NaCl in 0,1 M Puffer fortgesetzt. Es wurde bei allerdings geringer Proteinbeladung der Säule von 51,6 mg folgendes Ergebnis gefunden.

Mit 0,008 M Puffer ausgespült:	9,8 mg Prot. = 19%
Bis zu den NaCl Gradienten "	: 26,1 mg Prot. = 51%
Mit NaCl herausgespült	: 25,7 mg Prot. = 49%

Die mit Puffer erhaltene Menge befindet sich mit 51% in der gleichen Größenordnung wie die Summe der Pufferfraktionen der anderen Homogenate des Corpus luteum (58%).

Auch andere Autoren arbeiteten bei der Fraktionierung an Sephadex-Ionenaustauschern mit Puffern sehr geringer Molarität.

LUNDBLAD (34) verwendete bei der Prüfung der proteolytischen Aktivität des Serums an DEAE Sephadex A 25 einen 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,6. R.KOTZAUREK und B.SCHOBEL (29) äquilibrierten ihre DEAE Sephadexsäule A 50 medium bei der Untersuchung der alkalischen Seriumphosphatase mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,6 und eluierten mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0,08; 0,12; 0,17; 0,284; 0,6M). Sie fanden 2, bei Pankreaskopfkarcinom und Verschlußikterus 3 aktive Fraktionen.

Tabelle 5: DIE EIWESBINDUNG BEI VERWENDUNG VON 0,2 M PUFFER

Herkunft des Eiweißes	pH	Eiweiß aller Fraktionen in mg	Pufferfraktionen Summe in mg	In %	Gebundenes EW in mg
1. Liquor folliculi	5	717,0	567	79,1	150
2. Liquor folliculi	5	930	839	90	91
3. Liquor folliculi	5	752	615	82	137
4. Liquor folliculi	5	788	710	90,1	78
5. Homogenat vom Gesamtovar	5	47	5,6	11,9	41,4
6. Homogenat vom Gesamtovar	5	72,3	15,7	21,6	56,65
7. Homogenat vom Corpus luteum	5	86,7	50,9	59	35,8
8. Homogenat vom Corpus luteum	5	176	98,8	56	77,2
9. Homogenat vom Corpus luteum	5	64,2	37,3	58,1	26,9
10. Testsküle mit Corpus luteum	5	51,6	9,8	19	41,7

37
:

4. Diskussion

a) Besprechung der Ergebnisse der Alkalischen Phosphatase

Bei der Chromatographie der Alkalischen Phosphatase fanden wir im Homogenat 8, im Liquor 6 Aktivitätszacken. Es fehlen im Liquor A IV und A VI. Diese Zacken weisen auch im Homogenat nur die Aktivität von 1,8 γ Phosphat pro Stunde auf.

Das konstante Auftreten der übrigen Aktivitäten bei bestimmten Ionenkonzentrationen und besonders die Zuordnung derselben zu bestimmten Proteinwellen der Eiweißkurve, hier vor allem A I₁, A I₂, A II₁, A III und A V, gibt die Sicherheit, daß es sich jedesmal um ein genau definiertes Protein mit Phosphataseaktivität im alkalischen Bereich handelt.

Am markantesten erscheinen im Homogenat A I₁, A I₂ und auch noch A II₁ mit Aktivitäten von 46,6, 42,0 und, in zwei Fraktionen, 5,5 und 4,6 γ Phosphat/Stunde. Die restlichen Aktivitäten befinden sich in der Größenordnung von 1-3,5 γ P/St.

Im Liquor gesellt sich zu den zwei größten und A II₁, hier 11,0, 3,7 + 5,5 und 5,5 γ P/St, noch die Zacke A V mit 10,1 γ P/St. Diese erscheint im Homogenat als eine flache Aktivität über 3 Fraktionen (2,7 + 1,8 + 1,8 γ P/St).

D.W.MOSS (41) hatte in der Leber durch Elektrophorese ebenfalls 4 aktive Fraktionen der Alkalischen Phosphatase erhalten, doch besaßen die Fermente gleiche Konstanten, gleiches pH-Optimum und gleiche Aktivierung durch Mg, woraus er schloß, daß es sich um eine Alkalische Phosphatase handelt, aber Teile des Enzyms bei der Isolierung verändert worden sind. A.L.GROSSBERG (17) konnte ebenfalls nicht nachweisen, ob es sich bei den 3-4 Komponenten, die er aus Niere, Darm, Leber und Milz gewonnen hatte, um verschiedene alkalische Phosphatasen handelt.

Auch im Ovar fanden wir jetzt 3-4 vorherrschende Kom-

ponenten, was darauf hindeutet, daß die Veränderungen bei der Isolierung entweder nach einem bestimmten Schema verlaufen, oder daß es sich entgegen der Ansicht von MOSS doch um multiple Enzyme handelt, die sich nicht in biochemischen Gesichtspunkten (Umsatzzahl, pH-Optimum), sondern nur in physikalischen (Molekulargewicht, Lichtstreuung) oder chemischen (Sequenzanalyse, funktionelle Gruppen) Gesichtspunkten unterscheiden.

Auf jeden Fall unterscheiden sich die Fermente auf Grund ihrer verschiedenen Eluierbarkeit bei der Ionenaustauschchromatographie in ihrer Nettoladung. Dies kann durch geringfügige Änderung des Molekülbaus zustande kommen, ohne daß sich die biochemischen Konstanten nennenswert zu ändern brauchen: Carboxylgruppen können durch Amidbildung neutralisiert werden oder die Seitenketten unterscheiden sich etwas. P. PORTMANN und G. GERFAUX (44) stellten fest, daß es sich bei der Alkalischen Phosphatase der Darmmukosa um ein Glykoprotein mit 7% Hexose und 5% Hexosamin handelt. Es besteht also die Möglichkeit einer leichten Variation der Seitenketten.

b) Besprechung der Ergebnisse der Sauren Phosphatasen:

Nicht so einheitlich wie bei den Alkalischen Phosphatasen ist das Bild bei den Sauren Phosphatasen. Hier finden wir 9-10 Aktivitätszacken.

Im Gesamtovarialhomogenat sind am deutlichsten ausgeprägt S I₁, S I₂, S I₃, S II und S IV₁ (153,5; 48,0; 8,9; 11,6; 8,2 μ P/St ist die höchste Aktivität pro Peak). Für die Aktivitäten besteht eine Zuordnung zum auslaufenden Eiweiß. In den übrigen Fraktionen wurden weniger als 5 μ P/St freigesetzt.

Im Homogenat des Corpus luteum sind S I₁, S I₂ und S I₃ ebenfalls am besten ausgebildet (35,6; 8,2; 8,9 μ P/St). Dann folgen aber nicht S II und S IV₁ (1,4 +

2,1; 4,1 γ P/St), sondern S III₁ und S III₂ (6,9 + 4,1; 6,9 γ P/St). Die Aktivität liegt allgemein etwas niedriger, weil, statt 10 ml wie in den übrigen Versuchen, nur 5 ml Fermentlösung auf die Säule gebracht wurden.

Im Liquor folliculi sind alle Aktivitätspeaks unter 5 γ P/St. Am größten erscheinen auch hier S I₁, S I₂, S I₃ und, allerdings etwas verzögert auslaufend, S III₂ (4,8; 3,4 + 4,8; 3,4; 4,1 γ P/St).

Wir sehen also:

1. In den Geweben und im Liquor sind jeweils die allein mit Puffer eluierten aktiven Fraktionen I₁, I₂ und I₃ am kräftigsten ausgebildet.
2. Daneben zeigen, je nach Gewebe verschieden, ein oder zwei Fraktionen ebenfalls eine erhöhte Aktivität.
3. Die restlichen Peaks sind sehr klein und stellen wohl Kunstprodukte dar, die bei der Aufarbeitung des Gewebes entstanden.

Ad 1.

T.WIELAND und G.PFLEIDERER berichten (5^B), daß die Zahl der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase in allen Geweben gleich ist. Werden nicht alle 5 Enzyme gefunden, so nur, weil die Verteilung der Gesamtaktivität über die Einzelkomponenten in den verschiedenen Organen verschieden ist. Entfallen auf eine Komponente nur Bruchteile von Prozentsen, so ist diese sehr schwer nachzuweisen.

Da diese Feststellung der Konstanz der Zahl der Isoenzyme im Genbestand der Zelle begründet ist, kann sie wohl auch auf andere Fermente in Geweben derselben Tierklasse übertragen werden.

Die aus dem regelmäßigen Auftreten im Gesamthomogenat, Corpus luteum und Liquor und aus der Größe der Aktivitäten gezogene Folgerung, daß es sich bei den Zacken I₁, I₂ und I₃ um Isoenzyme handelt, wird unterstützt durch das Auffinden von 3-4 Isoenzymen in der Ratten- und der Men-

schenleber (40) (45).

Der endgültige Beweis muß durch Reindarstellung der Enzyme und Nachweis verschiedener biochemischer, physikalischer und chemischer Eigenschaften erbracht werden.

Ad 2.

Ob es sich bei den unter 2. aufgeführten Fermenten um selbständige Isoenzyme handelt, ist zweifelhaft. Es kann sich um Enzymkomplexe im Sinne von MARKERT, C.L., und MÖLLER (36) oder auch, wie bei 3. vermutet, um Denaturierungserscheinungen des Fermenteiweiß handeln.

D.ROGERS und F.J.REITHEL (48) erhielten 1960 bei der Chromatographie der Sauren Phosphatase von *Escherichia coli* an DEAE-Cellulose drei Aktivitätsgipfel. Die Fermente besaßen an verschiedenen Substraten verschiedene Wirksamkeit. Bei der Prüfung der Peaks auf Einheitlichkeit mittels Stärkegelelektrophorese spalteten sich zwei Fraktionen weiter auf. Auch sie vermuteten Enzymkomplexe.

J.W.BLAKE und R.H.LEE (4) sind ebenfalls der Meinung, daß Bindungen zwischen Enzym und großen oder kleinen Molekülen Anlaß zu verschiedenen, getrennt wandernden Aktivitäten geben können. Als angelagerte Moleküle kommen in Frage: Andere Proteine, Nucleinsäuren, Substrate und Lipide.

Ad 3.

E.MANGOLIASH und J.LUSTGARTEN (35) fanden bei der Chromatographie von gereinigtem, einheitlichem Cytochrom C durch die Einwirkung denaturierender Reagentien (Trichlor-essigsäure) 4 Komponenten. Starke Scherkräfte, der Zerschäumungseffekt und Oxydation durch O_2 -Beimengung können z.B. bei der Zerkleinerung des Materials im Homogenisator nach Potter-Elvehjem die Proteine ebenfalls denaturieren. Die kleinen Aktivitäten der vorliegenden Kurven sind wohl auf diese Weise entstanden.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Im Liquor von Follikeln aus Schweineovarien wird eine hohe Aldolaseaktivität nachgewiesen. Die Aktivität ist in den kleinen Follikeln am größten und vermindert sich mit zunehmender Follikelgröße.

Bei der Fraktionierung der Zellen des Corpus luteum und Corpus rubrum der Schweineovarien werden 27,2 und 18,1 % der Aktivität in der Mitochondrienfraktion gefunden. Dies läßt auf multiple Formen der Aldolase schließen. Die Mitochondrien weisen auch die höchste spezifische Aktivität auf.

Mit physiologischer Kochsalzlösung wird die spezifische Aktivität der Aldolase des Cytoplasma bei Corpus luteum und rubrum bestimmt.

Bei der Fraktionierung der Alkalischen und Sauren Phosphatasen mit Hilfe von Sephadex-Ionenaustauschern werden die Fermente in 6 bis 10 Fraktionen verteilt gefunden.

Auf Grund der Größe der Aktivität und des regelmäßigen Auftretens in Gesamtovar, Corpus luteum und Liquor wird vermutet, daß es sich bei den durch Puffer eluierten Aktivitäten um Isoenzyme handelt. Es sind bei der Sauren Phosphatase 3, bei der Alkalischen Phosphatase 2 Zacken.

Eine genaue Deutung dieser und auch der übrigen kleineren Aktivitäten ist auf Grund dieser Untersuchungen nicht möglich.

Der Einfluß der Puffermolarität auf die Eiweißbindekazität von CM Sephadex C 50 wird gezeigt.

V. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- Nr. 1 BÄSSLER K.H. in Hoppe-Seyler Thierfelder
Band 6, Teil A S.652 (1964)
- 2 BALASS R. und Neurochem. (London) 5, 1, 1959.
LOGNADO J.R.
- 3 BEET A.E. Nature 175, 513, 1955.
- 4 BLAKE J.W. J. biol. Chem. 235, 1359, 1960.
MOORE B.
LEE R.H.
- 5 BOOD A. Amer. J. Physiol. 168, 728, 1952.
- 6 BRUNS F. und Klin. Wochenschr. 32, 1041 (1954).
PULS W.
- 7 BÜCHNER T. und Angew. Chem. 70, 552 (1958).
KLINGENBERG K.
- 8 CHRISTIE C. und Proc. roy. Soc. B. 141, 420
JUDAH G. (1954).
- 9 CLAYTON B.E. Arch. Dis. Child. (London) 38,
199 (1963).
- 10 DALE R.A. Clin. chim. Acta 5, 652 (1960).
- 11 DASTAGUE G. und Bull. Soc. Chim. Biol. 41, 767
BASTIDE P. (1959).
- 12 DELBRÜCK A. Biochem. Z. 331, 273 (1959).
- 13 DOUNCE A.L. und J. biol. Chem. 173, 159 (1948).
BEYER
- 14 EMERY A.J. und Biophys. and Biochem. Cytol.
DOUNCE A.L. 1, 315 (1955).
- 15 FORREST C. und J. biol. Chem. 236, 1980 (1961).
DOHERTY D.
- 16 GREEN D.E. und Ann. Rev. Biochem. 24, 1, (1955).
BEINERT H.
- 17 GROSSBERG A.L. Arch. Biochem. 93, 267 (1961).
- 18 HEYKE H. Klin. Wochenschr. 41, 904 (1963).
- 19 HINDSBERG K. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 10,
218 (1958).

- 20 HOOGEBOOM H. J. biol. Chem. 172, 614
SCHNEIDER W. und (1948).
PALLADE
- 21 JENNER H.D. und Hoppe-Seyler Thierfelder
KAY H.D. Band V S.173 (1953)
- 22 JUNG G. und HELD H. Arch. f. Gyn. 192, 146 (1959).
- 23 JUNG G. Arch. f. Gyn. 193, 285 (1959).
- 24 JUNG G. und KIDESS A. Arch. f. Gyn. 196, 457 (1962).
- 25 JUNG G. Habilitationsschrift (Tübingen)
S. 48.
- 26 JOHNSON M.K. Biochem. J. 77, 610 (1960).
- 27 JOHNSON M.K. Biochem. J. 82, 281 (1960)
- 28 KIDESS E. Diss. Tübingen Med.Fakultät: Unter-
suchungen über Fermente im Ovarge-
webe (1960)
- 29 KOTZAUREK R. und Klin. Wochenschr. 41, 956
SCHOBEL B. (1963)
- 30 LANG K. und Flaschenträger Lehnartz Band II
SIEBERT G. 1b S.1064 (1954)
- 31 LOHMANN K. und Biochem. Z. 178, 419 (1926).
JENDRASSIK L.
- 32 LONDON M. und Arch. Biochem 46, 141 (1953).
HUDSON B.P.
- 33 LUDWIGSEN B.J. Lab. Clin. Med. 61, 329 (1963).
- 34 LUNDBLAD G. Acta chem. Scand. 975 (1962).
- 35 MANGOLIASCH E. und Ann.N.Y. Acad. Sci. 94, 731 (1961).
LUSTGARTEN J.
- 36 MARKERT C.L. und Proc. Nat. Acad. US 45, 753
MÖLLER C. (1959).
- 37 MEYERHOF O. und Biochem. Z. 271, 89 (1934).
LOHMANN K.
- 38 MEYERHOF O. und Biochem. Z. 271, 102 (1934).
LOHMANN K.
- 39 MEYERHOF O. und Biochem. Z. 273, 73 (1934).
LOHMANN K.
- 40 MOORE B. und Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 659
ANGLETTI P. (1961).
- 41 MOSS D.W. Nature 193, 981 (1963).

- 42 NEILAND J.B. Scientia 115, 143 (1952).
- 43 NEILAND J.B. J. biol. Chem. 199, 373 (1952).
- 44 PORTMANN P. und CERFAUX G. Chimia 15, 428 (1961).
- 45 POTTER V.R. und ELVENHEJEM C.A. J. biol. Chem. 114, 492 (1936).
- 46 REITH A., SCHMIDT E. und SCHMIDT F.W. Med. Wochenschr. 42, 915 (1964).
- 47 Report of the Commission on Enzymes 1961, Symposium Series, Vol. 20, Pergamon Press London.
- 48 ROGERS D. und REITHEL F.J. Arch. Biochem. 89, 97 (1960).
- 49 ROODYN D.B. Biochem. u. biophys. acta 25, 129 (1957).
- 50 SACKTOR B. Arch. Biochem. 45, 419 (1953).
- 51 SCHMIDT, F.W. und E. Klin. Wochenschr. 38, 957 (1960).
- 52 SIBLEY J.A. und LEHNINGER A.E. J. biol. Chem. 177, 859 (1949).
- 53 SHEPERD J.A. J. biol. Chem. 213, 405 (1955).
- 54 WACHSMUTH E.D. und PFLEIDERER G. Biochem. Z. 336, 545 (1963).
- 55 WARBURG O. und CHRISTIANSEN W. Biochem. Z. 314, 149 (1943).
- 56 WARBURG O. und CHRISTIANSEN W. Biochem. Z. 310, 384 (1941).
- 57 WATTIAUX R. und DE DUVE C. Biochemio. J. 63, 606 (1956).
- 58 WIELAND T. und PFLEIDERER G. Angew. Chem. 74, 261 (1962).

VI. ABKÜRZUNGEN

=====

A	=	Alkalische Phosphatase
ATP	=	Adenosintriphosphat
CPK	=	Kreatininphosphokinase
DAP	=	Dioxyazetonphosphat
FDP	=	Fruktosediphosphat
GAP	=	Glyzerinaldehydphosphat
GAPDH	=	Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDH	=	Glyzerophosphatdehydrogenase
GOT	=	Glutamat-Oxalat-Transaminase
Ho	=	Homogenat
LDH	=	Laktatdehydrogenase
NADPH	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (früher DPNH)
S	=	Saure Phosphatase
TIM	=	Trioseisomerase

L e b e n s l a u f

Ich, Gert Frösner, wurde am 14.5.1942 in Tübingen als Sohn des Assistenzarztes Dr.med.Herbert Frösner und seiner Ehefrau Annemarie, geborene Schneider, geboren.

Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Mörikeschule, bis 1961 das Kepler-Gymnasium in Tübingen.

Nach Erlangung des Reifezeugnisses am 8.März 1961 studierte ich Medizin: sechs Semester an der Universität in Tübingen, wobei ich nach dem zweiten Semester die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem fünften Semester die ärztliche Vorprüfung ablegte, ein Semester im Sommer 1964, an der Universität in Wien und weitere vier Semester an der Tübinger Universität.

Am 1.Februar 1967 habe ich die ärztliche Prüfung bestanden.

